

研究报告

柑橘黄龙病赣南脐橙内生菌种群结构分析

熊大维* 金丹凤 顾斌涛 黄国昌 黄筱萍 刘兰

(江西省科学院微生物研究所 江西 南昌 330096)

摘要:【目的】分析赣南脐橙黄龙病植株和健康植株叶片内生菌,对比不同培养条件下培养出的内生菌,为筛选出对柑橘黄龙病原菌有影响的伴生菌奠定理论基础。【方法】通过 PCR 方法对脐橙中黄龙病菌进行验证,并基于 16S rRNA 基因高通量测序技术对患病与健康赣南脐橙叶片内生菌以及不同培养基富集培养后的内生菌进行多样性分析。【结果】所采集样品中有 5 株患病株,5 株健康株。5 株病株中共同含有的细菌属有 13 个,其中 7 个在 5 株健康株中也共同存在。*Deffluviococcus* 属和 *Granulicella* 属在病健株植物中都是优势菌属,且在健康株中的平均含量高于病株。病株与健康株的样品相似度存在明显界线。富集培养后不同样本和不同培养基中菌属分布不同。肠杆菌属(*Enterobacter*)、短小杆菌属(*Curtobacterium*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)和泛菌属(*Pantoea*)得到了大量富集,不动杆菌属和沙雷氏菌属等 9 个菌属富集量较少。另外,培养和未培养各样本间未分类菌(Unclassified)含量差异也较大。【结论】赣南脐橙患病植株和健康植株叶片内生菌有着明显差异,黄龙病菌的存在改变了脐橙叶片原有内生细菌的菌群结构。从活体植物组织内直接检测才能得到真正的植物内生菌群落分布情况。通过分析菌群的差异,有望找到与柑橘黄龙病菌生长相关的伴生菌。

关键词: 黄龙病, 赣南脐橙, 内生细菌, 16S rRNA 基因, 菌群分布

Endophytic bacterial community in Gannan navel orange affected by huanglongbing

XIONG Da-Wei* JIN Dan-Feng GU Bin-Tao HUANG Guo-Chang
HUANG Xiao-Ping LIU Lan

(Institute of Microbiology, Jiangxi Academy of Science, Nanchang, Jiangxi 330096, China)

Abstract: [Objective] To analyze the endophytic bacteria in leaves of Huanglong disease affected and healthy Gannan navel oranges, and to compare the bacterial community under different culture conditions. [Methods] *Candidatus Liberibacter* was verified by PCR. Based on 16S rRNA gene high throughput sequencing, the diversity of endophytic bacteria in the leaves of diseased and healthy plants (each five plants) cultured in different media was analyzed. [Results] Thirteen strains existed in diseased plants and seven of them were also found in all healthy plants. The dominant bacterial

Foundation item: Science and Technology Project of Jiangxi Province (No. 2015BBB60263)

*Corresponding author: Tel: 86-791-88175975; E-mail: xiongdawei@163.com

Received: May 25, 2016; Accepted: September 08, 2016; Published online (www.cnki.net): September 29, 2016

基金项目: 江西省科技计划项目(No. 2015BBB60263)

*通讯作者: Tel: 86-791-88175975; E-mail: xiongdawei@163.com

收稿日期: 2016-05-25; 接受日期: 2016-09-08; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2016-09-29

population of both diseased and healthy plants was mainly from *Deffluviococcus* sp. and *Granulicella* sp., whose average contents in healthy plants were higher than that in diseased ones. The similarity of diseased and healthy samples had obvious boundary. The strains obtained after cultivation in different samples and media were different. *Enterobacter* sp., *Curtobacterium* sp., *Pseudomonas* sp. and *Pantoea* sp. got a lot of enrichment, whereas the enrichment of 9 genera including *Acinetobacter* sp. and *Serratia* sp. was less. Besides, the amount of unclassified bacteria in the samples had obvious differences. **[Conclusion]** There were obvious differences between endophytic bacteria in disease and healthy Gannan navel oranges. The existence of *Ca. Liberibacter* changed the bacterial community structures. Only direct detection from the living plant tissue could obtain the real endophytic bacterial distribution. It is expected to find the bacteria associated with *Ca. Liberibacter* growth by analyzing the community difference of bacteria.

Keywords: Huanglongbing, Gannan navel orange, Endophytic bacteria, 16S rRNA gene, Bacterial community

柑橘黄龙病(Citrus Huanglongbing, HLB)是由不可培养的韧皮部杆菌(*Candidatus Liberibacter*)引起的一种毁灭性病害。该病菌存在亚洲种(*Ca. L. asiaticus*)、非洲种(*Ca. L. africanus*)和美洲种(*Ca. L. americanus*),均可通过木虱和嫁接进行传播^[1]。赣南脐橙产业是中国脐橙主产区,是赣州重大特色产业,近几年柑桔黄龙病在赣州蔓延,2013年以来,全市18个县(市、区)共砍伐黄龙病树1000多万株,占全市总株树的10%以上,给脐橙产业带来重大损失。目前对患病的果树无根本性的解决方法,国内外在柑橘黄龙病的预防和治疗方面的研究投入了大量的人力和物力,但仍然无法获得有效的途径和方法,树体一旦受到侵害,必须彻底砍除、挖兜并烧毁,以防止其蔓延。

植物内生细菌是植物体内正常存在的微生态群落,不同类型的微生物之间可以相互作用以保持植物体的动态平衡^[2]。已有研究表明,柑橘黄龙病患果树内存在多种内生菌,而且呈多样性分布,同一果树不同部位其内生菌种类、量大小均有明显区别^[3]。这些内生菌和黄龙病病原菌共同存在于患病果树中,有着直接或间接的相互作用。Trivedi等^[4]发现柑橘根部存在类芽孢杆菌(*Paenibacillus validus*)、梭形芽孢杆菌(*Lysinibacillus fusiformis*)、地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)、恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*)、*Microbacterium oleivorans*和普城沙雷氏菌(*Serratia plymutica*)时,叶片中的黄

龙病菌数量明显下降。李佳等^[5]发现中短小杆菌属(*Curtobacterium* sp.)、欧文氏菌属(*Erwinia* sp.)、蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)为患病长春花内生细菌的优势菌群,鞘胺醇单胞菌属(*Brevundimonas* sp.)、芽孢杆菌属(*Bacillus* sp.)为健康长春花内生细菌的优势菌群,黄龙病菌的存在可以改变长春花原有内生细菌的菌群结构且菌群多样性下降。植物内生细菌可影响植物的生长发育并可用于生物防治,合理利用植物的内生微生物具有重要的理论意义和实用价值。目前关于赣南脐橙黄龙病病原菌的共生菌筛选、纯化培养研究工作相对较少,本研究采用分子生物学方法和常规传统方法相结合,分析罹病与健康脐橙植株叶片内生细菌种群多样性并找寻优势菌群,探讨伴生细菌与黄龙病菌的互作关系,为柑橘黄龙病菌的病原学研究以及防治奠定基础。

1 材料与方法

1.1 供试植物

试验用脐橙叶片均采自江西赣州赣县劳田村脐橙生产基地(E115°12', N26°04')。选定10棵植株(样本编号:051101、051102、051103、051104、051105、051106、051107、051108、051109、051110),其中疑似病、健植株各5株,分别采集叶片样品,所有采集样品用自封口熟料袋封装后4℃保存,并在一周内处理。

1.2 培养基

脐橙汁液制备:取新鲜无农药残留的脐橙榨

汁, 用纱布过滤去除果肉等纤维组织, 灭菌, 4 °C 保存备用。

培养基: LB 培养基^[5], 脐橙汁液培养基(LB 培养基+脐橙汁液 60 mL/L, pH 5.5)。

1.3 主要试剂

细菌基因组 DNA 提取试剂盒、Omega Soil DNA Kit 提取试剂盒、SanPrep 柱式 DNA 胶回收试剂盒, 上海生工生物工程有限公司; 引物合成、2×Taq Mix 酶, 北京鼎国生物技术有限公司。

1.4 内生细菌的富集培养

样品的灭菌处理^[6]: 叶片用 75%的乙醇冲洗去除叶片表面等异物, 再用无菌水冲洗 2 次, 4%的次氯酸钠浸泡 4 min, 无菌水浸泡 3 次, 每次 1 min, 取最后一次的浸泡水 100 μL 在 LB 培养基上平板涂布, 28 °C 培养 48 h, 检验叶片表面消毒是否完全。

内生菌的富集培养: 在无菌间内, 将表面消毒处理好的叶片(样品 051102、051105、051108)剪成约 0.25 cm² 碎片, 每个样品均分别浸泡于 LB 培养基(编号: P051102、P051105、P051108)和脐橙汁液培养基(编号: P051102H、P051105H、P051108H)中, 28 °C、180 r/min 培养 48 h。

1.5 内生菌总基因组的提取

内生菌富集培养液总基因组 DNA 提取: 各培养菌液分别取 1 mL 于 2 mL 离心管中, 用细菌 DNA 提取试剂盒提取总基因组 DNA。

叶片内生菌总基因组 DNA 提取: 称取 0.5 g 玻璃珠于 5 mL 离心管中, 加入 0.2 g 样本, 以 Omega D5625-01 Soil DNA Kit 提取试剂盒提取。

1.6 内生菌和黄龙病菌的验证

以提取的内生细菌总 DNA 为模板, 分别以细

菌通用引物 341F/805R 和黄龙病菌特异性引物 OI1/OI2c 扩增。引物序列以及扩增程序如表 1、表 2 所示。PCR 扩增体系均为 50 μL: 2×Taq Mix 25 μL, 10 μmol/L 引物各 1 μL, 模板 DNA 1 μL, ddH₂O 22 μL。PCR 所得产物于 1.5%的琼脂糖凝胶上电泳。

黄龙病引物扩增出的目的基因片段用凝胶纯化试剂盒纯化回收, 送至上海生工生物工程有限公司测序验证。

1.7 16S rRNA 基因高通量测序分析内生菌多样性

16S rRNA 基因高通量测序由上海生工生物工程有限公司完成, 通过 MiSeq 测序平台测定内生菌 V3-V4 高变区序列。将多条序列根据其序列之间的距离来对它们进行聚类, 后根据序列之间的相似性作为域值分成操作分类单元(Operational taxonomic unit, OTU)。在 OTU 聚类结果的基础上, 获取每一个 OTU 聚类中的代表性序列与 RDP classifier 数据库 (<http://rdp.cme.msu.edu/misc/resources.jsp>)、Silva 数据库(<http://www.arb-silva.de/>)和 Unite 数据库(http://www.mothur.org/wiki/UNITE_ITS_database)中的已知数据进行比对, 得到各 OTU 代表序列的分类学信息, 并在门纲目科属种水平统计各个样品的菌落组成。

表 1 PCR 扩增所需引物		
Table 1 The primers used for the PCR amplified		
Primer	Primer sequence (5'→3')	Size (bp)
341F	CCTACGGGNGGCWGCAG	17
805R	GACTACHVGGGTATCTAATC	20
OI1	GCGCGTATGCAATACGAGCGGCA	23
OI2c	GCCTCGCGACTTCGCAACCCAT	22

表 2 脐橙内生菌以及黄龙病原检测反应程序		
Table 2 PCR program of associated bacteria and citrus Huanglongbing pathogens detection		
Objective	Primers	Procedure
16S rRNA gene of total bacteria	341F/805R	94 °C 4 min; 94 °C 30 s, 58 °C 30 s, 72 °C 45 s, 30 cycles; 72 °C 7 min
Specific sequence of HLB pathogens	OI1/OI2c	94 °C 4 min; 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 80 s, 35 cycles; 72 °C 7 min

2 结果与分析

2.1 黄龙病原菌的确定

各样品内生菌总基因组 DNA 提取结果如图 1 所示, 未培养样品内生菌含量少, 所提取基因组含量较低, 富集培养后 DNA 含量明显提高。

利用 PCR 法将脐橙叶片进行了黄龙病原的分子检测, 经 PCR 扩增后, 能扩增出特异性条带, 说明这些叶片中含有黄龙病菌, 没有扩增出相应条带则说明不含有黄龙病菌。PCR 的扩增结果如图 2 所示。051101–051105 号样品扩增后得到长度为

1 075 bp 的特异性 DNA 序列, 经 BLASTn 比对后与已知韧皮部杆菌亚洲种的 16S rRNA 基因部分序列相似度达 99%。由此可以得出, 1–5 号植株感染了黄龙病, 且都是由韧皮部杆菌亚洲种引起, 6–10 号为健康株。

2.2 16S rRNA 基因高通量测序数据分析

将测序数据进行拼接后, 去除短片段序列(<50 bp)和 Reads 尾部质量值在 20 以下的碱基, 得到的序列大部分分布在 400–600 bp 之间, 平均长度均在 440 bp 以上(图 3)。

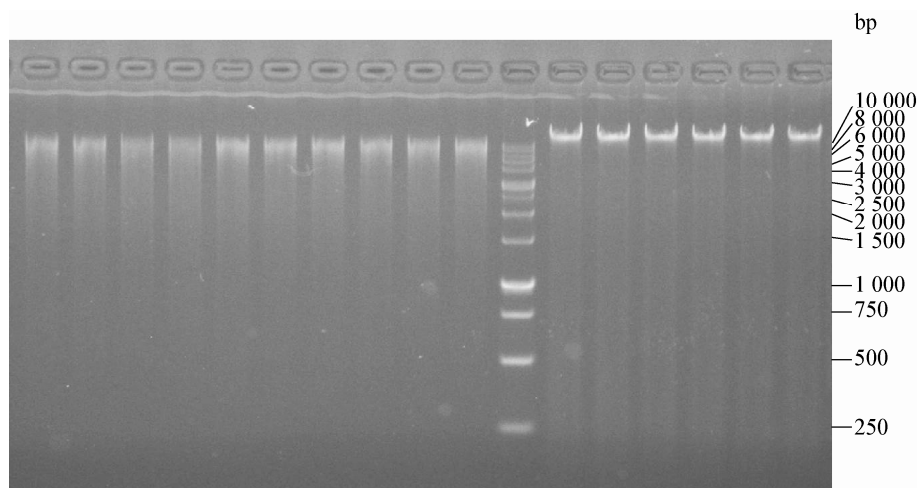


图 1 基因组 DNA 电泳图

Figure 1 Genomic DNA electrophoresis

Note: Samples: 051101, 051102, 051103, 051104, 051105, 051106, 051107, 051108, 051109, 051110, Marker, P051102, P051102H, P051105, P051108, P051108H.

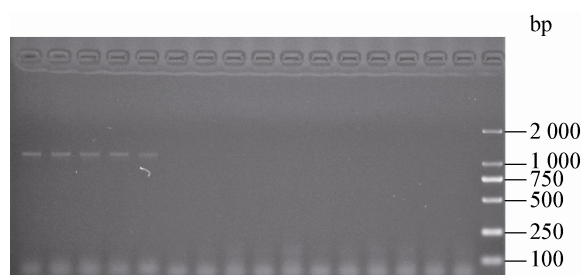


图 2 黄龙病原的分子检测结果

Figure 2 Patterns of PCR specifically amplification with citrus Huanglong pathogens

Note: Samples: 051101, 051102, 051103, 051104, 051105, 051106, 051107, 051108, 051109, 051110, P051102, P051102H, P051105, P051108, P051108H, Marker.

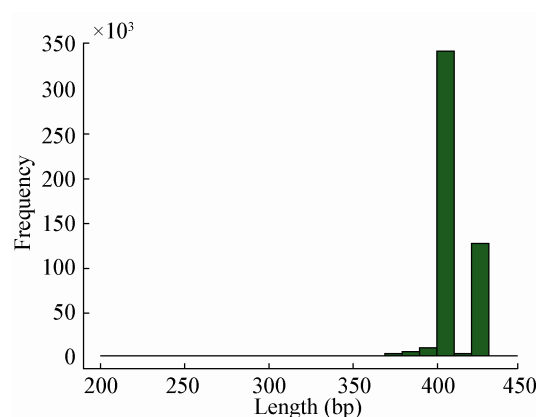


图 3 原始数据长度分布情况

Figure 3 Length distribution of original sequences

对各样品序列进行归类并根据序列的相似度分成很多分组，每一分组即一个分类操作单元(OTU)。不同 OTUs 测序结果与 GenBank 进行序列同源性比对并物种分类后，得到样品在各个分类水平上的分类学情况，其中各菌属的分布详见表 3。在各样品中还存在一些未分类菌(Unclassified)，由图 4 可以看出，1-10 号未培养的样品中的未分类菌较多，在培养后的样品中明显减少(P051108H 除外)，说明这些未分类菌大部分是不可培养的。而黄龙病株(1-5 号)各样本间未分类菌差异较大，健康植株(6-10 号)中数量较为稳定。

2.3 不同脐橙植株叶片内生菌的多样性

在一定环境条件下能大量繁殖并在种间竞争

中占优势的菌属即为优势菌属。由表 2 可以看出，5 株病株中共同含有的细菌属有 13 个，其中 7 个在 5 株健康株中也共同存在，有 5 个只在部分健康株中存在，而韧皮部杆菌是病株特有菌属。*Defluviicoccus* 属和 *Granulicella* 属在病健康株植物中都是优势菌属，且在健康株中的平均含量高于病株(图 5)。健康株中 *Rhodoligotrophos* 属和沙雷氏菌(*Serratia*)含量也多于病株，而其他菌属均在病株中含量较高。

样品间相似度分析表明(图 6)，病株(1-5 号)与健康株(6-10 号)之间界线明显，病株之间距离较近，其中 2 号和 4 号菌群分布相近，3 号、5 号和 1 号类似。此结果说明黄龙病菌对脐橙叶片内生菌群的生长分布有显著影响。

表 3 属水平上各样本主要分类、相应 Reads 数和所占比例																
Table 3 The main classification, corresponding reads number and the proportion of the samples in the genus level																
Genus	0511-01	0511-02	0511-03	0511-04	0511-05	0511-06	0511-07	0511-08	0511-09	0511-10	P0511-02H	P0511-02	P0511-05H	P0511-05	P0511-08H	P0511-08
<i>Granulicella</i>	38	13	18	2	16	12	8	17	14	32	0	0	0	0	0	0
<i>Defluviicoccus</i>	30	12	24	8	13	16	23	15	15	20	0	1	0	0	0	0
<i>Candidatus Profftella</i>	13	7	7	2	6	4	3	3	1	8	0	0	0	0	0	0
<i>Prevotella</i>	2	5	2	1	2	0	1	2	3	0	1	119	1	0	26	0
<i>Variovorax</i>	12	16	6	5	2	6	15	3	9	1	21	133	10	3	170	4
<i>Acinetobacter</i>	10	24	9	13	6	9	7	12	8	7	3	26	0	0	20	1
<i>Enterobacter</i>	9	1	13	8	2	0	0	5	0	7	7 724	26 187	32 590	1 253	23	18 502
<i>Candidatus Liberibacter</i>	7	1	2	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Serratia</i>	7	14	6	4	2	4	34	6	5	0	16	83	4	0	151	2
<i>Streptococcus</i>	7	4	2	3	1	1	2	4	7	0	10	141	2	1	56	1
<i>Rhodoligotrophos</i>	5	1	4	2	2	1	4	4	4	2	0	0	0	0	0	0
<i>Brevundimonas</i>	4	2	1	1	3	0	1	3	0	1	0	108	0	0	35	0
<i>Pseudomonas</i>	4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	4	112	20	9 095	18	7 923
<i>Asaia</i>	13	0	2	4	4	3	8	0	3	1	0	0	0	0	0	0
<i>Clostridium</i>	3	2	0	1	0	0	0	2	0	1	1	26	0	0	15	0
<i>Incertae Sedis</i>	3	4	2	0	1	0	1	2	0	1	1	94	1	0	41	0
<i>Thermus</i>	3	2	0	5	1	0	0	1	3	0	1	127	0	0	50	2
<i>Curtobacterium</i>	2	1	2	0	1	0	0	3	0	1	13 209	115	0	0	21 281	9
<i>Pantoea</i>	1	1	1	0	1	0	0	1	0	0	10	105	110	8 771	1	1 278

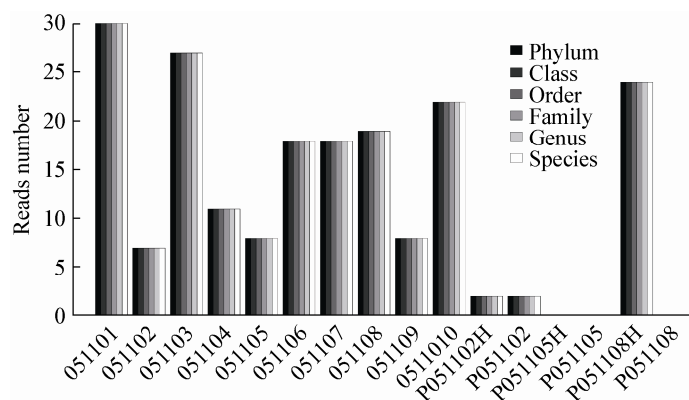


图4 各样品中所有水平未分类菌情况

Figure 4 The situation of non-classified bacteria in each sample

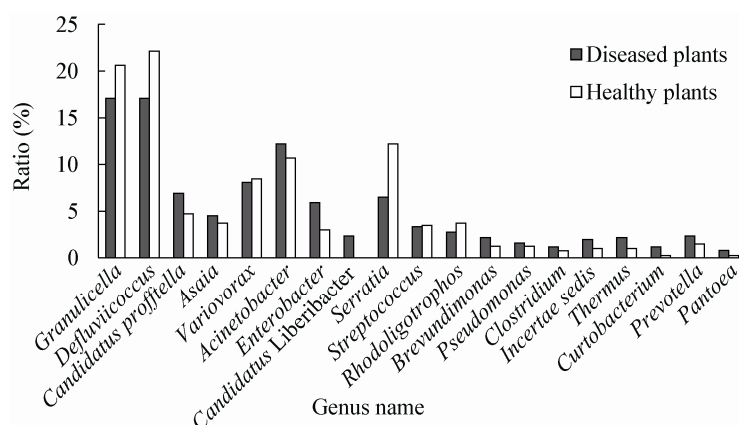


图5 病健脐橙植株叶片中属水平菌群分布

Figure 5 Bacterial distribution of diseased and healthy plants in the genus level

2.4 培养和未培养内生菌比较

将2号病株、5号病株和8号健株的内生菌进行培养后,得到大量富集的菌属有肠杆菌属(*Enterobacter*)、短小杆菌属(*Curtobacterium*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)和泛菌属(*Pantoea*)。在未培养内生菌中高丰度的 *Deftuicoccus* 和 *Granulicella* 在培养基中未得到富集,不动杆菌属、普雷沃菌属(*Prevotella*)、沙雷氏菌属、链球菌属、短波单胞菌属(*Brevundimonas*)等9个非优势菌属也得到了不同程度的富集,但富集量较少。这些菌在不同的样本和不同的培养基中的分布不同(图7)。由样品间相似度(图6)也可以看出,培养后样本菌群与未培养样本的内生菌群相关性小,距离远。

3 讨论

植物内生细菌是一类定殖在植物内部的细菌^[7],其种类组成及结构变化会受到植物自身生长状况以及外界环境的影响^[8]。外界病原菌的入侵也能造成植物内生菌群落结构的改变。目前,有关黄龙病病原菌入侵脐橙而造成内生细菌群落结构改变及两者关系的研究报道较少。本研究以感染黄龙病的脐橙和未感染黄龙病的健康脐橙为研究对象,经16S rRNA基因高通量分析,共获得19个内生菌属,其中有7个菌属在所有病健株中都共同存在,5个在所有病株和部分健株中存在。在病株中特有的菌种只有韧皮部杆菌,但病株叶片内生菌种类和数目与健康植株都不同,说明黄龙病感染初期引起了叶

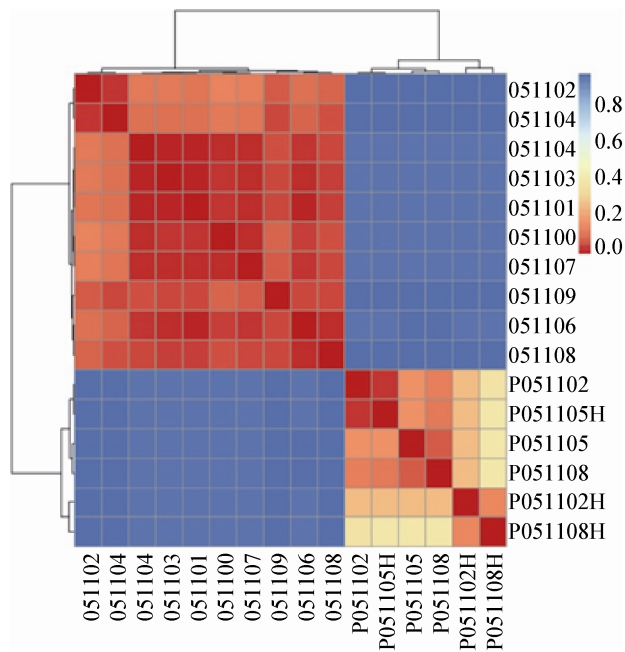


图 6 样本距离 Heatmap 图
Figure 6 The heatmap of sample distance
注：颜色块代表距离值，颜色越红表示样本间距离越近，相似度越高，颜色越蓝则距离越远。
Note : Color block represents the distance values, the more red color indicates closer distance and higher similarity, the more blue indicates farther distance.

片内生菌群的结构变化。这与 Araújo 等^[9]研究结果相一致。他们的研究也发现在被黄龙病原菌感染但不表现症状的柑橘植株中，内生细菌数量比健康植株高。同样也有研究表明黄龙病菌的存在可以改变植株原有内生细菌的菌群结构，且菌群多样性下降^[5]。另外，患病与健康植株中的未分类细菌数量差异也较大。虽然无法确定这些细菌的种类是否发生了变化，但这些细菌也可能受到黄龙病菌的影响。未分类菌与黄龙病菌之间的相互作用关系还需要进一步深入研究。

我们发现 *Defluviicoccus* 属、*Granulicella* 属是未培养植株中的优势菌属。而培养后的优势菌株是肠杆菌属、短小杆菌属和假单胞菌属等。这主要是由于细菌的培养受到所选用的培养基及培养条件的选择性影响，因此，培养后细菌的种类及数量丰富度不一定反映组织中细菌的真实状态，而非培养方法更能反映客观实际。李颜方等^[10]的研究中表明培养后的优势菌属是芽孢杆菌属和短小杆菌属，未培养样本的优势菌属是沙雷氏菌属和泛菌属，这与我们的研究结果不同，可能是由于柑橘与脐橙的

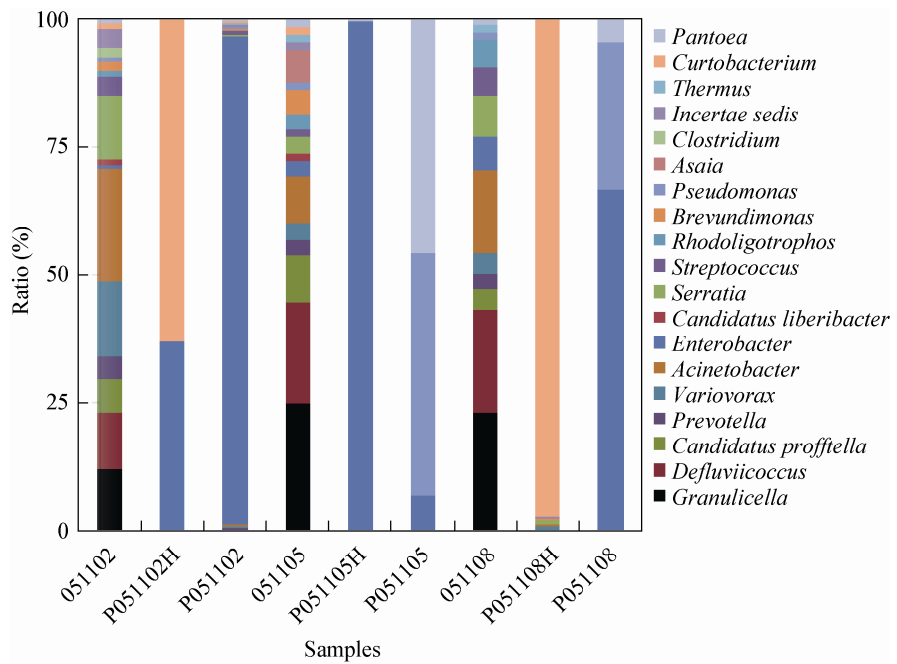


图 7 未培养与培养后样本中菌属分布比较
Figure 7 Comparison of the bacterial distribution in uncultured and cultured samples

内生菌种类有所不同,或者生长地域环境的不同引起了叶片内生菌群的差异,因为根际土壤是内生细菌的主要来源,内生细菌是由根向茎部以及叶片传播^[11]。由我们的结果可知,要想分离出对黄龙病菌有作用的伴生菌必须得到真正的植物内生菌群落分布,而即使用不同的培养基进行培养,也不能保证所有生活在植物组织内的内生菌都被分离出来,可能有的内生菌不能在人工培养基上生长,也有可能是植物正处在非内生性病原菌感染初期,因此富集培养后的优势菌可能并不是我们需要的功能性伴生菌。另外,内生菌长期生活在植物组织内部并与宿主植物协同进化,其形态特征必然发生一定的变化以适应其内生环境,那么传统的形态学分类标准是否能准确反映其分类地位也值得探讨。因此只有从活体植物组织内直接检测和鉴定内生菌,才能得到真正的植物内生菌群落分布情况。本研究采用高通量测序技术直接测定活体植物叶片中的内生菌群结构,结合富集培养后优势菌群的变化对比分析,对赣南脐橙黄龙病相关内生菌的研究具有重要意义。

参 考 文 献

- [1] Bové JM. Huanglongbing: a destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus[J]. *Journal of Plant Pathology*, 2006, 88: 7-37
- [2] Golinska P, Wypij M, Agarkar G, et al. Endophytic actinobacteria of medicinal plants: diversity and bioactivity[J]. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2015, 108(2): 267-289
- [3] Wang F, Yin YP, Sun LQ, et al. Endophytic bacterial community in the symptoms and symptomless tissues of HLB-affected citrus plant[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2014, 54(8): 868-875 (in Chinese)
王芳, 殷幼平, 孙丽琴, 等. 柑橘黄龙病罹病植株显症差异组织内生细菌群落结构分析[J]. *微生物学报*, 2014, 54(8): 868-875
- [4] Trivedi P, Spann T, Wang NA. Isolation and characterization of beneficial bacteria associated with citrus roots in Florida[J]. *Microbial Ecology*, 2011, 62(2): 324-336
- [5] Li J, Wang ZK, Xie P, et al. Endophytic bacterial community analysis of *Catharanthus roseus* and its association with huanglongbing pathogen[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2012, 52(4): 489-497 (in Chinese)
李佳, 王中康, 谢攀, 等. 长春花内生细菌多样性与柑橘黄龙病菌的相关性[J]. *微生物学报*, 2012, 52(4): 489-497
- [6] Wang ZY, Liu XJ, Yi Q. Comparison of surface disinfection conditions when isolating endophytic bacteria[J]. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2014, 42(8): 366-367 (in Chinese)
王志勇, 刘秀娟, 易曲. 植物内生菌分离时表面消毒条件的比较[J]. *江苏农业科学*, 2014, 42(8): 366-367
- [7] Guo LB, Qiu J, Han ZJ, et al. A host plant genome (*Zizania latifolia*) after a century-long endophyte infection[J]. *The Plant Journal*, 2015, 83(4): 600-609
- [8] Gong B, Yao XH, Zhang YQ, et al. A cultured endophyte community is associated with the plant *Clerodendrum inerme* and antifungal activity[J]. *Genetics and Molecular Research*, 2015, 14(2): 6084-6093
- [9] Araújo WL, Marcon J, Maccheroni WJ, et al. Diversity of endophytic bacterial populations and their interaction with *Xylella fastidiosa* in citrus plants[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68(10): 4906-4914
- [10] Li YF, Yin YP, Wang YX, et al. Isolation of facultative anaerobic and endophytic bacteria companioned Huanglongbing pathogen-infected citrus tissues and determination of dominant bacterial populations[J]. *Acta Phytopathologica Sinica*, 2011, 41(5): 546-550 (in Chinese)
李颜方, 殷幼平, 王玉玺, 等. 柑橘黄龙病兼性厌氧型伴生细菌的分离及优势菌群分析[J]. *植物病理学报*, 2011, 41(5): 546-550
- [11] Gagné S, Richard C, Rousseau H, et al. Xylem-residing bacteria in alfalfa roots[J]. *Canadian Journal of Microbiology*, 1987, 33(11): 996-1000